

Propriétés immunostimulantes d'un mélange d'hydrocarbures paraffiniques et de glycérides oléiques polyoxyéthylénés

par L. M. JOUBERT et L. R. VALETTE

Depuis leur découverte, en 1925, par RAMON (8, 9, 10), leur définition par STONE en 1963 (13) et de nombreux travaux de précision (2, 3, 4, 12), les substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité, ou *immunostimulants*, ont conquis une place importante en immunologie et sont devenues indispensables dans la préparation de nombreux vaccins inactivés. Leur emploi permet, en effet, de réduire la quantité d'antigène employée, mais surtout d'obtenir une immunité meilleure et prolongée, en particulier dans le domaine des maladies chroniques à prémunition, déterminées par des bactéries endotoxiques, comme la Brucellose.

Le mélange huileux étudié ici (W. L. 674 B) a augmenté l'activité immunologique de plusieurs préparations vaccinales, en particulier des vaccins anti-rouget, anti-colibacillaire, anti-salmonellique (JOUBERT et Coll., 5), anti-brucellique (VALETTE et JOUBERT, 16), anti-virus aphteux : il semble donc digne d'intérêt car, par ailleurs, il ne présente aucun inconvénient majeur.

I. — COMPOSITION ET PROPRIÉTÉS PHYSICOCIMIMIQUES ET BIOLOGIQUES DU MÉLANGE

1° Composition.

L'immunostimulant W. L. 674 B est un mélange défini :

— d'hydrocarbures paraffiniques sélectionnés en raison de leur grande fluidité,

— et de glycérides oléiques polyoxyéthylénés, correspondant à des huiles végétales de noyaux trans (ou inter) — estérifiés (Labrafil M. 1944 C). Les propriétés de ces glycérides ont été spécialement étudiées en raison de leur caractère huileux hydrodispersible, favorable à l'immunostimulation.

Bull. Acad. Vét. — Tome XXXX (Mars 1967). — Vigot Frères, Editeurs.

2° Propriétés physicochimiques.

A. — Le *mélange W. L.* est un liquide fluide, incolore ou jaune pâle, inodore, hydrodispersible, insoluble dans l'alcool, soluble dans les solvants organiques. Les spécifications en sont les suivantes : acidité libre (oléique) $< 0,5$ p. 100 ; indice d'acide < 1 ; indice de saponification 5 à 15 ; indice d'iode < 1 ; teneur en eau $< 0,2$ p. 100 ; cendres sulfuriques $< 0,01$ p. 100.

Son identification se fonde sur une réaction de *Draggendorf* positive et une recherche chromatographique positive après hydrolyse sur papier des polyoxyéthylèneglycols de P. M. moyen = 300.

B. — L'*huile interestérifiée* a été plus particulièrement étudiée (1, 5, 14, 15, 16). Elle appartient au groupe des glycérides oléiques polyoxyéthylénés de la Pharmacopée Française (*).

Elle est préparée grâce à la réaction, en présence de catalyseurs, pendant 8 heures sous pression atmosphérique, et à 205° — 230° C, d'un triglycéride sur un polyalcool, les polyoxyéthylènes glycols de P. M. compris entre 200 et 400.

Le produit final est un mélange, en proportions constantes, de mono- et di-polyglycides et de mono-, di- et tri-glycérides. L'interestérification est suivie d'une neutralisation et d'une filtration, jusqu'à l'obtention d'un produit répondant strictement à des normes analytiques bien définies. La stabilité en est très grande, de même que la résistance à la peroxydation.

Les propriétés physicochimiques du produit peuvent être ainsi résumées : couleur jaune paille ; odeur d'huile de noyaux ; densité à 20° C : 0,940 à 0,965 ; indice de réfraction $n_{20} = 1,465$ à $1,475$; acidité libre (exprimée en acide oléique) : moins de 1 p. 100 ; indice de saponification : 145 à 175 ; indice d'iode : 60 à 90 ; teneur en eau : moins de 0,5 p. 100 ; absence de soufre et de métaux lourds ; hydrodispersible, très soluble dans l'huile de paraffine, l'éther de pétrole, le chloroforme, l'éthyldiéthylène glycol, les huiles végétales et les alcools gras, assez soluble dans l'alcool éthylique, insoluble dans la glycérine et les glycols.

Les caractères de solubilité offrent une importance fondamentale pour la solubilisation de l'ensemble des immunigènes microbiens, voire parasitaires, protéiques, glucidiques ou lipidiques. En effet, cet excipient hydrolipophile réalise un pont entre les excipients hydrosolubles et les excipients hydrophobes. Il permet la solubilisation simultanée des éléments hydro- et lipo-solubles de l'immuni-

(*) Codex Français 1965, p. 524.

gène, en particulier des endotoxines lipo-polyosidoprotidiques, dont le couple polyoside + protéine constitue l'immunigène spécifique et le lipoïde A de WESTPHAL, l'élément toxique adjuvant de l'immunité.

3° *Propriétés biologiques — Toxicologie et Pharmacologie.*

Les propriétés toxiques du produit sont très faibles, à court ou long terme, soit primaires, soit secondaires, allergiques ou anaphylactiques. Seule l'injection intraveineuse chez le chien risque, à doses élevées (10 à 20 ml), de déclencher un choc (hypotension, tachycardie) généralement bien supporté.

Les propriétés pharmacologiques du produit revêtent une importance considérable puisqu'elles correspondent, au moins en grande partie, aux éléments de son pouvoir immunostimulant, grâce à une meilleure présentation des immunigènes devant les cellules compétentes.

Grâce à ses qualités détersives discrètes, grâce aussi à son caractère hydrolipophile, le produit :

— d'une part, homogénéise les cultures bactériennes sans manifester un net pouvoir antiseptique (14) ;

— d'autre part, permet une diffusion de traceurs (colorants, éserine) intermédiaire entre celle, rapide, de l'eau et celle, très lente, des huiles (14,1) ;

— enfin, procure un effet retard sur les traceurs (antibiotiques) inférieur aux huiles (6,14), sans pouvoir phlogogène vraiment appréciable.

L'ensemble de propriétés aussi favorables l'a désigné comme excipient de choix pour les antibiotiques, les hormones, les vitamines, comme support des solutés huileux injectables et buvables, comme véhicule digne d'intérêt en dermatologie et en cosmétologie, comme immunostimulant vaccinal, d'autant que les réactions locales demeurent discrètes et éphémères.

4° *Propriétés immunostimulantes.*

A. — *Principe.*

L'étude du pouvoir immunostimulant du W. L. 674 B a été poursuivie vis-à-vis de divers immunigènes de nature chimique différente : protéique (anatoxine tétanique), lipopolyosidoprotéique (vaccins brucelliques), dans la proportion générale de 80 p. 100 de la préparation vaccinale concentrée.

L'examen de la qualité adjuvante de cet excipient s'est opéré par

comparaison avec d'autres adjuvants connus, dans des conditions expérimentales similaires.

B. — *Matériel, méthodes et techniques.*

L'activité immunisante a été recherchée, non par la méthode sérologique indirecte, contestable, mais systématiquement par la méthode immunologique directe par vaccination puis épreuve toxique ou virulente différée.

1. — *Immunigènes* : Entre autres, deux types d'immunigènes, ont été étudiés :

- un antigène protéique toxique soluble : anatoxine tétanique ;
- un antigène lipopolyosidoprotidique bactérien : vaccins anti-brucelliques.

a) *L'anatoxine tétanique* utilisée était purifiée et concentrée par précipitation à l'acide métaphosphorique. Elle fut, soit mélangée à l'excipient huileux en deux proportions (0,06 ml + 10 ml et 0,1 ml + 10 ml), soit adsorbée sur hydroxyde d'alumine (H. A.) selon les mêmes proportions.

b) *Vaccins anti-brucelliques* : Deux vaccins inactivés spécifiques ont été comparés :

1) *Vaccin 45/20*, préparé à partir d'une souche rugueuse R de *Brucella abortus*, non agglutinogène, suivant la technique de MAC DIARMID (7). Ce vaccin comporte une phase aqueuse contenant 400×10^9 bactéries tuées par le formol, pour une dose bovine de 3 ml, dispersée dans un excipient. Les trois excipients utilisés sous volume de 8 ml pour 2 ml de suspension brucellique aqueuse, étaient, soit l'excipient huileux hydrodispersible (W. L.), soit l'excipient incomplet de Freund (Mayoline 90 p. 100, Arlacel 10 p. 100 = M. A.), soit le vaccin aphteux saponiné (I. F. F. A. Lyon = F. A.) (*).

2) *Vaccin H. 38*, préparé à partir d'une souche lisse S. de *Brucella melitensis*, selon la méthode de RENOUX (11). Il est constitué également d'une suspension de *Brucella* tuées par le formol à raison de 400×10^9 bactéries par ml pour une dose vaccinale bovine de 3 ml, en phase aqueuse dispersée dans deux excipients différents, W. L. et adjuvant incomplet de FREUND (M. A.), sous volume de 8 ml pour 2 ml de suspension brucellique aqueuse.

(*) Cette dernière expérience poursuivait un autre dessein : la possibilité d'une vaccination double associée anti-brucellique — anti-aphteuse et la stimulation réciproque des deux immunigènes.

2. — *Opérations* : La valeur immunisante des deux préparations a été examinée comme suit :

a) *Anatoxine tétanique* (Tableau n° 1). Six lots (A, B, C, D), dont deux témoins (T1 et T2) de 10 cobayes albinos, lignée K, de 350 grammes, sont vaccinés par la voie sous-cutanée. Un mois plus tard, un prélèvement de sang est pratiqué et le titrage des anticorps antitétaniques sériques déterminé par la méthode classique du L⁺/10 sur souris albinos, lignée RAP, de 18 grammes.

Les cobayes sont ensuite éprouvés avec 10 DMM de toxine tétanique étalon par voie crurale, tandis que les témoins reçoivent une seule DMM par la même voie. La lecture intervient à la 96^e heure (paralysie en +, mort en M). On peut en tirer un indice d'immunité comparatif des deux excipients pour chaque dose d'anatoxine utilisée :

$$I = \frac{\text{négativité de l'épreuve après Anatoxine + W. L.}}{\text{négativité de l'épreuve après Anatoxine + M. A.}}$$

b) *Vaccins antibrucelliques*.

— *Sur souris* (Tableau n° 2). Six lots de souris albinos RAP pesant 16 à 18 grammes (5 expérimentaux A, B, C, D, E et un témoin T) sont inoculés par voie sous-cutanée à la dose de 0,2 ml de chaque préparation vaccinale, selon le protocole :

Expérience :

Lot A : vaccin H. 38 + W. L.	40 souris
Lot B : vaccin H. 38 + M. A.	40 souris
Lot C : vaccin 45/20 + W. L.	40 souris
Lot D : vaccin 45/20 + F. A.	40 souris
Lot E : vaccin 45/20 + M. A.	40 souris

Témoins :

Lot T : W. L. seul	50 souris
--------------------------	-----------

Après 6 semaines, les animaux sont éprouvés par la voie péritonéale par la souche virulente de référence, *Brucella abortus* 544 Weybridge, dont la dose infectante 50 p. 100 (DI 50) est préalablement déterminée et vérifiée sur le lot témoin.

L'épreuve est quantitative et chaque lot est subdivisé en quatre groupes de 10 animaux recevant respectivement 1, 10, 100 et 1.000 DI 50.

Un mois plus tard, soit 10 semaines après la vaccination, les animaux sont sacrifiés.

Sur chacun d'eux, 3 prélèvements sont effectués (foie, rate, reins) et congelés. Puis un gramme du broyat est ensemencé et les colonies

TABLEAU N° 1

*Influence de l'immunostimulant vis-à-vis de l'anatoxine tétanique
dans l'immunité antitétanique chez le Cobaye*

Résultats Lots Cobayes	Vaccination Anatoxine + Immunostimulant (1 ml par voie sous- cutanée)	Séroneutralisation sur souris (après 1 mois) (en unités internationales antitoxiques)	Epreuve (*) Toxine tétanique après 1 mois (lecture 96 ^e heure)	Indice d'immunité 0 = Anatoxine + W. L. 0 = Anatoxine + H. A.
EXPÉRIENCE	A 10 cobayes	Anatoxine 0,06 ml + W. L. 10 ml	0,90 u. i. (0,7-1,2)	0 0 0 0 0 0 ++ ++ ++ +
	B 10 cobayes	Anatoxine 0,06 ml + H. A. 10 ml	0,25 u. i. (0,1-0,4)	0 0 0 0 ++ ++ ++ ++ ++ +
EXPÉRIENCE	C 10 cobayes	Anatoxine 0,1 ml + W. L. 10 ml	2 u. i. (1,5-2,5)	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
	D 10 cobayes	Anatoxine 0,1 ml + H. A. 10 ml	0,55 u. i. (0,4-0,7)	0 0 0 0 0 0 0 0 ++ +
TÉMOINS	T ₁ 10 cobayes	W. L. seul 10 ml	0	M M M M M M M +++ ++++ ++++ ++++
	T ₂ 10 cobayes	0	0	10 M

(*) 0 : Pas de lésion ; + à ++++ : degrés de paralysie ; M = mort.

de *Brucella* dénombrées. On calcule alors la DI 50 des souris vaccinées (une seule colonie dans le broyat entraîne l'inscription de l'animal dans la colonne des infectés), que l'on compare à la DI 50 des animaux témoins.

Un indice d'immunité est alors calculé, grâce au rapport :

$$\frac{\text{DI 50 vaccinés}}{\text{DI 50 témoins}}$$

— Sur *cobayes* (Tableau n° 3) : Des essais parallèles, en tous points semblables, ont été effectués sur cobayes albinos de lignée K, d'un poids moyen de 400 grammes, vaccinés à l'aide de 1 ml de vaccin par voie sous-cutanée, puis éprouvés et sacrifiés de la même manière. Trois lots expérimentaux de 20 cobayes ont été utilisés et trois lots témoins également, selon le protocole :

Expérience :

Lot A : vaccin 45/20 + W. L.	20 cobayes
Lot B : vaccin 45/20 + F. A.	20 cobayes
Lot C : vaccin H. 38 + W. L.	20 cobayes

Témoins :

Lot T1 : W. L. seul	20 cobayes
Lot T2 : F. A. seul	20 cobayes
Lot T3 : 0	40 cobayes

3. — *Résultats :*

1) *Immunité antitétanique* (Tableau n° 1).

Il apparaît que l'immunité antitétanique humorale et totale obtenue pour chaque dose d'anatoxine (0,06 ml et 0,1 ml) s'avère respectivement 2 fois et 1,25 fois plus élevée avec l'immunostimulant W.L. qu'avec l'hydroxyde d'alumine, mise à part l'immunité supérieure obtenue avec de fortes doses d'anatoxine. Il apparaît aussi que les témoins ayant reçu 1 ml de W. L. seul sont sensiblement plus résistants à la toxine d'épreuve que ceux n'ayant pas reçu d'excipient, en raison d'une vraisemblable résistance non spécifique.

2) *Immunité antibrucellique sur souris* (Tableau n° 2).

L'indice d'immunité comparatif montre, outre la supériorité du vaccin H. 38 sur le vaccin 45/20, que l'excipient vaccinal joue un rôle important, le W.L. étant environ deux fois plus actif que l'excipient M.A. et 10 fois plus actif que le vaccin F.A. saponiné adsorbé sur hydroxyde d'alumine.

3) *Immunité antibrucellique sur cobaye* (Tableau n° 3).

L'indice d'immunité montre encore, outre la supériorité du

TABLEAU N° 2

*Influence de l'immunostimulant vis-à-vis de divers vaccins antibrucelliques
dans l'immunité antibrucellique chez la Souris*

Résultats Lots Souris	Vaccination (0,2 ml par voie sous-cutanée)	Epreuve (après 6 semaines) Nbre bactéries infectantes	Lecture (après 10 semaines)					DI 50	Indice d'immunité DI 50 vaccinés DI 50 témoins
			Nombre souris infectées	Nombre souris indemnes	% infection observée	% infection calculé	% organes infectés		
EXPÉRIENCE	<i>A</i> 40 souris	H. 38 + W. L.	1.800 18.000 180.000	0/11 2/11 3/8	11 9 5	0 % 18 % 38 %	0 % 12 % 50 %	0 % 6 % 33 %	850.000 bactéries $\frac{850.000}{800} = 1.000$
	<i>B</i> 40 souris	H. 38 + M. A.	1.800 18.000 180.000	0/9 1/9 5/6	9 8 1	0 % 11 % 83 %	0 % 10 % 85 %	0 % 3,6 % 43 %	351.000 bactéries $\frac{351.000}{800} = 440$
	<i>C</i> 40 souris	45/20 + W. L.	1.800 18.000 180.000	2/9 1/10 4/6	7 9 2	22 % 10 % 66 %	10 % 21 % 78 %	13 % 26 % 75 %	85.000 bactéries $\frac{85.000}{800} = 100$
	<i>D</i> 40 souris	45/20 + F. A.	1.800 18.000 180.000	5/9 5/7 8/9	4 2 1	55 % 71 % 88 %	41 % 77 % 95 %	40 % 52 % 96 %	10.000 bactéries $\frac{10.000}{800} = 12$
	<i>E</i> 40 souris	45/20 + M. A.	1.800 18.000 180.000	1/7 3/10 6/9	6 7 3	14 % 30 % 66 %	6 % 28 % 77 %	13 % 19 % 74 %	45.000 bactéries $\frac{45.000}{800} = 56$
	TÉMOINS <i>T</i> 50 souris	0	18	4/10	6	40 %	31 %	16 %	800 bactéries $\frac{800}{800} = 1$
			180	4/10	6	40 %	53 %	20 %	
			1.800	8/8	0	100 %	94 %	66 %	
			18.000	9/10	1	90 %	96 %	90 %	
			180.000	9/9	0	100 %	100 %	100 %	

vaccin H. 38 sur le vaccin 45/20, la supériorité du W.L., 6 fois plus actif environ que le vaccin F. A., pour le vaccin 45-20. Chez les témoins, la stimulation non spécifique supérieure du W. L. est également notable.

4. — *Mécanisme d'action :*

L'excipient huileux ici étudié paraît agir (5) principalement grâce à une stimulation cellulaire du système réticulo-endothélial. En outre, il a été vérifié sur de nombreux animaux (souris, cobayes, bovins) que sa résorption locale était complète : ainsi est évitée l'escarre entraînant éventuellement *in situ* l'élimination de l'antigène ou, au contraire, l'enkystement en lipome plus ou moins définitif, séquestrant l'antigène hors du milieu intérieur. Cette qualité fondamentale le différencie nettement des excipients huileux classiques et le destine judicieusement à l'emploi de support de l'activité des vaccins antibactériens, en particulier pour les immunigènes lipopolysodoprotidiques complexes et dans la protection contre les maladies chroniques prémunisantes, à immunité cellulaire fondamentale, comme la Brucellose. Son utilisation paraît également très favorable dans le domaine des vaccins antitoxiques et aussi anti-virus, par exemple pour l'obtention de sérums hyperimmuns antiaphteux chez le cobaye.

En accord avec UNGAR, HOLT, HENNESSEN, SHEFFIELD, ASSO, RETHY (6), cet adjuvant semble, sans susciter de dangereux épiphénomènes allerge-anaphylactiques, répondre aux diverses activités des immunostimulants en général : réduction du gaspillage de l'immunigène, mise sous condition de l'hyperplasie cellulaire immuno-compétente, réduction des doses immunitaires pour une activité supérieure, création éventuelle d'un dépôt irritatif inducteur de la réponse secondaire, détoxication partielle des immunigènes endotoxiques.

CONCLUSIONS

1° Une huile de noyaux interstérifiée hydrodispersible, le W. L. 674 B, définie par des propriétés, physico-chimiques précises et non toxique, a été étudiée comme immunostimulant.

2° La stimulation immunitaire, recherchée sur cobaye pour un vaccin antitoxique (anatoxine tétanique) et pour des vaccins antibactériens (vaccins antibrucelliques) sur souris et cobayes, s'est montrée favorable et statistiquement significative.

3° Il est plausible de rapporter, au moins en grande partie, cette action stimulante à une mise en condition des cellules compétentes,

TABLEAU N° 3

*Influence de l'immunostimulant vis-à-vis de divers vaccins antibrucelliques
dans l'immunité antibrucellique chez le Cobaye*

Résultats Lots Cobayes	Vaccination (1 ml par voie sous-cutanée)	Epreuve après 6 semaines Nbre bactéries infectantes	Lecture (après 10 semaines)					DI 50	Indice d'immunité DI 50 vaccinés DI 50 témoins
			Nombre cobayes infectés	Nombre cobayes indemnes	% infection observé	% infection calculé	% organes infectés		
EXPÉRIENCE	A 20 Cobayes	230	0/4	4	0 %	0 %	0 %	23.000 bactéries	$\frac{23.000}{400} \neq 60$
		2.300	0/4	4	0 %	0 %	0 %		
		23.000	2/4	2	50 %	50 %	62 %		
		230.000	4/4	0	100 %	100 %	92 %		
	B 20 Cobayes	230	1/4	3	33 %	10 %	8 %	3.900 bactéries	$\frac{3.900}{400} \neq 10$
		2.300	0/4	4	0 %	14 %	0 %		
		23.000	4/5	1	80 %	71 %	60 %		
		230.000	2/3	1	66 %	87 %	77 %		
	C 20 Cobayes	230	0/4	4	0 %	0 %	0 %	230.000 bactéries	$\frac{230.000}{400} \neq 600$
		2.300	0/4	4	0 %	0 %	0 %		
		23.000	0/4	4	0 %	0 %	0 %		
		230.000	1/6	5	16 %	16 %	13 %		
TÉMOINS	T ₁	2.300	6/9	3	66 %	66 %	55 %	1.000 bactéries	$\frac{1.000}{400} = 2,5$
		23.000	10/10	0	100 %	100 %	86 %		
	T ₂	2.300	8/10	2	80 %	80 %	53 %	500 bactéries	$\frac{500}{400} = 1,2$
		23.000	8/8	0	100 %	100 %	100 %		
	T ₃	23	2/10	8	20 %	12 %	23 %	400 bactéries	$\frac{400}{400} = 1$
		230	6/10	4	60 %	57 %	43 %		
		2.300	8/10	2	80 %	87 %	73 %		
		23.000	10/10	0	100 %	100 %	83 %		

à la solubilisation simultanée des immunigènes hydrosolubles et liposolubles, et à une résorption relativement rapide et complète de l'immunigène vaccinal.

(Ecole Nationale Vétérinaire,
Service de Maladies Conta-
gieuses, et Institut Mérieux,
Lyon).

BIBLIOGRAPHIE

1. BOST (J.) et FARGEAS (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1565 et 1957 ; **151**, 1424.
2. COULAUD (E.). — *C. R. Soc. Biol.* 1935, **119**, 368.
3. JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 372.
4. JACOTOT (H.). — *Rev. d'Immunologie*, 1962, **26**, 112.
5. JOUBERT (L.), VALETTE (L.), CARRAZ (M.) et FASSI-FEHRI (M.). — *Bull. Soc. Sci. Vet. Lyon*, 1965, **67**, 221.
JOUBERT (L.) et CHAMBON (J.). — *Ann. Pharm. Fr.*, 1959, **17**, 543.
6. LEBOURDELLES (B.) et DESBORDES (J.). — *Rev. Hyg. Méd. Soc.* 1966, **14**, 297.
7. MAC DIARMID (A.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, **102**, 792.
8. RAMON (G.). — *C. R. Acad. Sci.* 1925, **181**, 157.
9. RAMON (G.), RICHOU (R.), THIERY (J.) et GERBEAUX (C.). — *C. R. Acad. Sci.* 1949, **229**, 278.
10. RAMON (G.), RICHOU (R.), THIERY (J.), GERBEAUX (C.) et LEPLATRE (J.). — *Rev. d'Immunologie*, 1950, **14**, 205.
11. RENOUX (G.). — *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 1957, **34**, 19.
12. SAENZ (A.). — *C. R. Soc. Biol.* 1935, **120**, 1050.
13. STONE (S. M.). — in « L'antigénicité », p. 83. Monographie de l'Institut Pasteur, Flammarion éd. Paris, 1963.
14. SERVANTON (J.). — Propriétés antibioconservatrices et retard d'un nouvel excipient huileux hydrophile. Thèse Doct. Vet. Lyon, 1960.
15. VALETTE (L.). — Etude d'un nouvel excipient huileux hydrophile Thèse Doct. Vet. Lyon, 1957.
16. VALETTE (L.) et JOUBERT (L.). — *Bull. Soc. Sci. Vet. Lyon*, 1966, **67**, 431.
17. VALETTE (L.), JOUBERT (L.) et GATTEFOSSE (M.). — Symposium sur les Adjuvants Utrecht 1965, Karger éditeur.